

Perinatal modulators of respiratory outcome after preterm birth

Citation for published version (APA):

Been, J. V. (2010). *Perinatal modulators of respiratory outcome after preterm birth*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20100924jb>

Document status and date:

Published: 01/01/2010

DOI:

[10.26481/dis.20100924jb](https://doi.org/10.26481/dis.20100924jb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Introduction

Approximately ten percent of all babies is born preterm, at less than 37 weeks gestation. Preterm birth is associated with increased morbidity and lifelong complications. The most important complication early after birth is respiratory distress, due to the lungs being immature. There is a deficiency of surfactant, a complex mixture of lipids and proteins required to keep the lungs open. In these infants, breathing may be supported by mechanical ventilation and oxygen supplementation. In addition, exogenous surfactant may be administered to treat respiratory distress.

Although such treatments are often necessary to ensure survival of preterm infants, they may cause harm to the immature lungs of these babies. Consequently, an important subset may develop chronic lung disease (bronchopulmonary dysplasia; BPD). BPD is associated with long-term complications including impaired lung function, increased susceptibility for infections, and neurodevelopmental delay.

Chapter 1 provides an introduction on normal lung development. Its disruption by preterm birth is discussed and how this may lead to chronic lung disease. **Chapter 2** describes the role of surfactant in both the aetiology and treatment of neonatal respiratory distress. In **chapter 3** the role of antenatal exposure to inflammation in the development of neonatal lung disease is discussed. Preterm birth is highly associated with occurrence of chorioamnionitis, an inflammatory process within the uterus. The fetal lungs are exposed to this inflammation through direct contact with the amniotic fluid. Previous studies have shown that chorioamnionitis enhances lung maturation, thus preparing the fetus for potential preterm delivery. On the other hand evidence suggests an adverse effect of chorioamnionitis on subsequent lung development (as opposed to lung maturation). Thus, while the fetal lungs seem to benefit from exposure to inflammation on the short term, the eventual outlook may well be less favourable.

Overview

The current thesis describes several processes that take place within the lung during the first postnatal week in preterm infants. We aimed to gain additional insight in the underlying causes of chronic lung disease in this group. Special attention is given to the role of chorioamnionitis. In addition, the effect of maternal administration of steroids before delivery is studied. Steroids are adrenal gland hormones that are known to enhance fetal lung maturation. Antenatal administration of steroids thus prepares the fetus for imminent preterm delivery.

Summary of the thesis

Part of the thesis describes analyses done in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). When infants are mechanically ventilated, the ventilator is attached to a small tube entering the trachea. Through this tube a catheter is advanced into a certain lung section. A small amount of saline is flushed into the lung, after which suction is applied while the catheter is withdrawn. In this way a sample of lung-derived fluid is obtained. BALF contains cells and molecules which reflect the state the lung is in at that time.

In **chapter 4**, quantification of a large group of inflammatory mediators in BALF is reported. Inflammatory mediators are molecules that regulate inflammation in the lung, for example by attracting or activating white blood cells. Using a new technique (luminex immunoassay) we show that it is feasible to quantify these mediators in a very small amount of BALF. Levels of these factors were linked to several clinical aspects of lung disease in preterm infants. Using this approach, we found that antenatal exposure to chorioamnionitis increases the presence of inflammatory mediators directly after birth. Previous reports have shown pulmonary inflammation to be linked to the development of chronic lung disease. However, in our study we were unable to reproduce these findings. We hypothesise that the increasing awareness of minimising lung injury through reduction of mechanical ventilation and oxygen supplementation may have contributed to this.

As mentioned earlier, both chorioamnionitis and administration of antenatal steroids affect lung development already before birth. **Chapter 5** describes the specific effects of these factors on lung injury repair. Alveolar type 2 cells were cultured in the laboratory. These cells are very important for the lung, since they produce surfactant and are necessary for the formation of type 1 cells. When cultured, these cells form a thin layer. The cell layer was wounded by scratching the surface, resulting in a linear defect. This is a well recognised model for epithelial injury in general, and for alveolar epithelial injury in this case. BALF was added to the wounded cell layer, and the effects on epithelial repair were evaluated. BALF from infants exposed to chorioamnionitis was much less effective in inducing wound repair. This may partly explain the increased risk for lung injury in ventilated infants exposed to chorioamnionitis. Conversely, epithelial repair was stimulated by BALF from infants in whom antenatal steroids had been given. We investigated whether these effects could be explained by altered expression of two growth factors known to be important for lung development (vascular endothelial growth factor; VEGF, and keratinocyte growth factor; KGF). However, we were unable to establish a significant effect of these factors.

Several other growth factors with important roles in lung development besides VEGF and KGF were quantified in BALF. In **chapter 6** we show that important differences are present in the levels of these factors between infants who do and do not develop chronic lung disease. Decreased BALF levels of VEGF directly after birth predict subsequent development of chronic lung disease several weeks later. Together with the results reported in chapter 4, these data support the current concept in which disruption of lung develop-

ment seems more important than other processes including inflammation in the aetiology of chronic lung disease. Quantification of growth factors may facilitate early identification of a risk profile for chronic lung disease which may be used to tailor postnatal respiratory management.

Several causes of preterm birth other than chorioamnionitis are associated with fetal hypoxia due to impaired placental function. Previous reports on effects of prenatal hypoxia on lung development have yielded contradictory results. The chick embryo develops outside of the mother, thus allowing for the effects of hypoxia to be studied without interference maternal influences. In **chapter 7** we show that short-term hypoxia stimulates surfactant production, while long-term hypoxia has no significant effect. Thus, the effects of hypoxia on lung development seem highly dependent on timing and duration of the stimulus. Additional experiments again suggest an important role for VEGF in this process.

Exposure to hypoxia and mechanical ventilation are known to injure lung. In **chapter 8** we investigated whether this would result in injury to the genetic material (DNA) within the lung. We focused on DNA from mitochondria, the energy producing organelles within the cell, while this DNA is known to be most susceptible to injury. Surprisingly, no DNA injury was found during mechanical ventilation for a mean duration of three days, albeit in a small group of infants. Increased awareness of the potentially injurious effects of mechanical ventilation and hyperoxia may have contributed to our findings.

In **chapter 9** we explored the association between chorioamnionitis and the occurrence of known complications of preterm birth in a cohort of preterm infants. We found that chorioamnionitis leads to a decrease in acute respiratory problems in this group, indicative of enhanced lung maturation. On the other hand, the incidence of severe infections after birth is increased after chorioamnionitis. In addition we investigated how antenatal administration of steroids affected the incidence of postnatal complications in infants with chorioamnionitis. Administration of antenatal steroids was associated with a decrease in acute respiratory problems and intraventricular haemorrhage in this group. This is important, because to date antenatal steroids are believed to be harmful when chorioamnionitis is present (**appendix I**).

To further evaluate this effect, our data were combined with those of similar studies previously published as described in **chapter 10**. The overall effect of antenatal steroids in all studies together can be evaluated by means of a statistical technique called meta-analysis. The results indicated that besides a reduction in acute respiratory problems and intraventricular haemorrhage, antenatal steroids were associated with increased survival. However, several aspects complicate interpretation of these findings, and we cannot draw definite conclusions regarding the safety and efficacy of antenatal steroids in infants with chorioamnionitis. Additional research on this topic is needed to further improve the outcome of preterm infants.

While previous studies showed a direct association between chorioamnionitis and chronic lung disease, we were unable to reproduce this (**chapter 9**). The results of one particular study suggest that chorioamnionitis is associated with an increased risk for

chronic lung disease only when combined with prolonged mechanical ventilation or post-natal sepsis. In **chapter 11** we investigated whether these findings could be reproduced in our cohort described in chapter 9. While we could confirm an association between prolonged mechanical ventilation and chronic lung disease, we were unable to detect significant associations between chorioamnionitis, sepsis, and chronic lung disease. Again, part of these inconsistencies may be explained by improvements in treatment of preterm infants over time.

The complex association between chorioamnionitis and chronic lung disease is further explored in **chapter 12**. We show that ventilated infants with chorioamnionitis have a less effective response to surfactant treatment. This necessitates prolonged use of mechanical ventilation and increased use of supplemental oxygen. These factors then contribute to an increased risk for chronic lung disease in these infants, particularly those with severe chorioamnionitis. Altogether the relationship between chorioamnionitis and chronic lung disease is a complex one, in which decreased surfactant efficacy seems to play a role. Additional research is needed to investigate whether chorioamnionitis-exposed infants could benefit from increased surfactant dosing or addition of anti-inflammatory agents to surfactant.

Conclusion

The results reported in this thesis provide new insights into the background of lung development and lung damage in preterm infants. Our findings are in agreement with the concept of the changing pathophysiology of chronic lung disease in this group. In addition, our data underline the intriguing and complex effects that chorioamnionitis may have with regard to the lung and other organs. Additional research is needed to evaluate the long-term effects of preterm birth and chorioamnionitis in particular, in order to improve the prospects for future preterm babies (**appendix II**). Several results reported in this thesis provide new directions for future research to develop strategies to improve the treatment, and more importantly, the early recognition and prevention of chronic lung disease after preterm birth.

Nederlandse samenvatting

Introductie

Rond de tien procent van alle kinderen wordt te vroeg geboren (voor de 37^e zwangerschapsweek). Vroeggeboorte gaat gepaard met een verhoogd risico op allerlei complicaties, die gevolgen kunnen hebben voor de rest van het leven. Ademhalingsproblemen vormen de belangrijkste complicatie direct na de geboorte. De longen zijn nog onderontwikkeld en er is een tekort aan surfactant, een mengsel van stoffen dat de longblaasjes openhoudt. De ademhaling kan worden ondersteund door middel van beademing en het geven van zuurstof. Ook kan surfactant als medicijn worden toegediend.

Deze behandelingen zijn vaak noodzakelijk voor de overleving van de vroeggeboren baby, maar gaan ook gepaard met schade aan de onderontwikkelde longen. Hierdoor ontstaat bij een belangrijk deel van deze kinderen chronische longschade (bronchopulmonale dysplasie; BPD). Deze ziekte gaat niet alleen gepaard met langdurige beperking van de longfunctie, maar ook met een verhoogde gevoeligheid voor infecties en slechtere neurologische ontwikkeling.

In **hoofdstuk 1** wordt de normale longontwikkeling beschreven. Tevens wordt uitgelegd hoe deze bij vroeggeboorte wordt verstoord, waardoor chronische longschade kan ontstaan. In **hoofdstuk 2** wordt de rol van surfactant in het ontstaan van ademhalingsproblemen na de geboorte besproken. Daarnaast wordt besproken hoe het geven van surfactant als medicijn de acute ademhalingsproblemen na vroeggeboorte kan verminderen. **Hoofdstuk 3** gaat in op de rol van blootstelling van de long aan ontsteking vóór de geboorte. Vroeggeboorte gaat vaak gepaard met chorioamnionitis, een ontsteking binnen de baarmoeder. De longen van de foetus staan via het vruchtwater in contact met deze ontsteking. Eerder onderzoek heeft laten zien dat hierdoor de longrijping wordt versneld; de foetus wordt als het ware voorbereid op een mogelijke vroeggeboorte. Aan de andere kant zijn er aanwijzingen dat chorioamnionitis slecht is voor de latere ontwikkeling van de long. Waar de foetus dus op korte termijn voordeel lijkt te hebben van deze ontsteking, kan dit op lange termijn wel eens nadelig zijn.

Overzicht

In dit proefschrift worden verschillende processen bestudeerd die zich in de long afspelen in de eerste week na de geboorte bij beademde vroeggeboren baby's. Het doel hiervan is meer inzicht te krijgen in de onderliggende oorzaken van chronische longschade in deze groep. Specifieke aandacht is er voor het effect hierop van blootstelling aan chorioamnionitis. Daarnaast wordt de invloed van het toedienen van steroïden aan de moeder voor de geboorte bestudeerd. Steroïden zijn bijnierschors hormonen en hebben een stimulerend effect op de longrijping van de foetus. Wanneer deze worden gegeven bij dreigende vroeggeboorte, is de foetus daarmee beter voorbereid op het leven buiten de baarmoeder.

Samenvatting proefschrift

In verschillende onderdelen van het proefschrift worden metingen gedaan in vloeistof verkregen via longspoeling (bronchoalveolaire lavage vloeistof; BALV). Kinderen die beademd worden, zijn via een buisje in de luchtpijp aangesloten op een beademingsmachine. Via dit buisje wordt een dun slangetje ingebracht in een deel van de long en wordt een kleine hoeveelheid zoutwater ingespoten. Dit wordt bijna direct weer opgezogen, waardoor materiaal uit de long wordt verzameld. BALV bevat onder andere cellen en moleculen en de samenstelling ervan zegt iets over de toestand van de long op dat moment.

In **hoofdstuk 4** wordt de meting van een grote groep ontstekingsfactoren in BALV beschreven. Ontstekingsfactoren zijn moleculen die een rol spelen in het reguleren van ontsteking, bijvoorbeeld door witte bloedcellen aan te trekken of te activeren. Met een nieuwe techniek (luminex immunoassay) laten we zien dat het goed mogelijk is deze stoffen te meten in een zeer kleine hoeveelheid BALV. Daarnaast hebben we een relatie gelegd tussen deze ontstekingsfactoren en aspecten van longproblemen bij deze vroeggeborenen. Zo blijkt dat blootstelling aan chorioamnionitis voor de geboorte leidt tot een toename van ontstekingsfactoren in de long direct na de geboorte. Eerdere onderzoeken lieten ook een belangrijke samenhang zien tussen ontsteking en de ontwikkeling van chronische longschade. Deze samenhang wordt in ons onderzoek niet meer gevonden. Wij denken dat een toenemende aandacht voor het beperken van de schadelijke gevolgen van beademing en zuurstoftoediening hieraan bijdraagt.

Zoals genoemd beïnvloeden chorioamnionitis en toediening van steroïden de longontwikkeling al voor de geboorte. In **hoofdstuk 5** wordt het specifieke effect van deze factoren onderzocht op herstel van longschade na de geboorte. In het laboratorium kweekten we een bepaald type longcellen, alveolaire type 2 cellen. Dit zijn cellen die van groot belang zijn voor de long, onder meer doordat ze surfactant aanmaken en als voorloper dienen voor type 1 cellen. Wanneer deze cellen worden gekweekt vormen ze een dunne laag. Hierin werd schade aangebracht door cellen over een bepaald traject weg te schrapen, waardoor een defect ontstaat. Dit is een veelgebruikt model voor slijmvlieschade en in dit geval voor longschade. Aan de beschadigde cellaag werd BALV toegevoegd, waarna werd gemeten in hoeverre dit het herstel bevorderde. Dit herstel bleek veel minder effectief wanneer kinderen voor de geboorte waren blootgesteld aan chorioamnionitis. Mogelijk verklaart dit ten dele waarom chorioamnionitis een verhoogd risico geeft op longschade bij beademde vroeggeborenen. Anderzijds werd het herstel juist extra gestimuleerd wanneer steroïden waren gegeven voor de geboorte. We onderzochten of twee groeifactoren die belangrijk zijn voor longontwikkeling (vascular endothelial growth factor; VEGF, en keratinocyte growth factor; KGF) van invloed waren op deze processen, maar konden geen duidelijk effect aantonen.

Naast VEGF en KGF hebben we verschillende andere groeifactoren die van belang zijn voor longontwikkeling, gemeten in BALV. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat er belangrijke verschillen zijn in de aanwezigheid van groeifactoren tussen kinderen die wel of geen

chronische longschade ontwikkelen. Zo is een tekort aan VEGF in BALV op de eerste dag na de geboorte al voorspellend voor het ontstaan van chronische longschade meerdere weken later. Samen met de bevindingen in hoofdstuk 4 ondersteunt dit de theorie dat chronische longschade tegenwoordig meer een gevolg is van verstoorde longontwikkeling dan van processen als ontsteking. Mogelijk kan het meten van groeifactoren in de toekomst helpen om vroeg een risico-inschatting voor chronische longschade te maken en daarop de behandeling aan te passen.

Naast chorioamnionitis gaan de meeste andere oorzaken van vroeggeboorte samen met een zuurstoftekort bij de foetus (hypoxie) door bijvoorbeeld verstoorde functie van de moederkoek (placenta). Eerdere onderzoeken laten tegenstrijdige effecten zien van hypoxie op de longontwikkeling. Kippenkuikens ontwikkelen zich buiten de moeder, waardoor het effect van hypoxie kan worden bestudeerd zonder effecten van de moeder. In **hoofdstuk 7** laten we zien dat kortdurende hypoxie de productie van surfactant in kippenembryo's stimuleert, terwijl langdurige hypoxie geen effect heeft. Het effect van hypoxie lijkt dus in belangrijke mate af te hangen van de duur van de blootstelling. Verdere experimenten suggereren dat VEGF ook hierbij een belangrijke rol speelt.

Blootstelling aan beademing en een teveel aan zuurstof zijn schadelijk voor de long. In **hoofdstuk 8** onderzochten we of er tijdens behandeling met beademing en zuurstof schade optreedt in het erfelijk materiaal (DNA). We bekeken hierbij in BALV het DNA van mitochondriën, de energieproducerende onderdelen van cellen, omdat dit DNA het meest gevoelig is voor schade. Opvallend genoeg werd geen schade aangetoond na een gemiddelde beademingsduur van drie dagen in een weliswaar kleine groep kinderen. Mogelijk speelt ook hier de toegenomen aandacht voor minder schadelijke beademing en verminderde blootstelling aan zuurstof een rol.

In **hoofdstuk 9** wordt de samenhang beschreven tussen chorioamnionitis en algemene complicaties van vroeggeboorte in een grote groep vroeggeborenen. We vonden dat chorioamnionitis minder ernstige acute ademhalingsproblemen geeft, passend bij een stimulatie van de longrijping in deze groep. Verder is het risico op ernstige infecties kort na de geboorte verhoogd na chorioamnionitis. Daarnaast bekeken we hoe toediening van steroïden voor de geboorte het optreden van complicaties beïnvloedt bij kinderen met chorioamnionitis. Kinderen met chorioamnionitis bleken minder acute ademhalingsproblemen en minder hersenbloedingen (intraventriculaire bloedingen; IVH) te hebben wanneer ze steroïden hadden gekregen. Dit is belangrijk, omdat in het algemeen wordt aangenomen dat steroïden gevaarlijk zijn bij chorioamnionitis (**appendix I**).

Om dit effect verder te onderzoeken werden de resultaten van ons onderzoek in **hoofdstuk 10** samengevoegd met die van vergelijkbare eerdere onderzoeken. Door een statistische techniek (meta-analyse) kan zo het totale effect van steroïden over alle onderzoeken samen worden onderzocht. Toediening van steroïden bleek niet alleen gerelateerd met minder acute ademhalingsproblemen en minder hersenbloedingen, maar ook met een betere overleving. Verschillende factoren bemoeilijken echter de uitleg van deze resultaten, waardoor de veiligheid en werkzaamheid van steroïden bij chorioamnionitis nog

niet vaststaan. Wij maken ons hard voor aanvullend onderzoek in deze richting, om zo de uitkomst van vroeggeborenen verder te verbeteren.

In tegenstelling tot eerdere onderzoeken, vonden wij geen directe relatie tussen chorioamnionitis en chronische longschade (hoofdstuk 9). In een van die eerdere studies wordt gesuggereerd dat het risico op chronische longschade na chorioamnionitis alleen is toegenomen wanneer deze kinderen na de geboorte langdurig worden beademd of een ernstige infectie (sepsis) krijgen. In **hoofdstuk 11** onderzochten wij of deze samenhang ook aanwezig was in de eerder beschreven groep vroeggeborenen van hoofdstuk 9. Hoewel we duidelijk zagen dat langdurige beademing het risico op chronische longschade verhoogde, kon geen samenhang worden aangetoond met chorioamnionitis of sepsis. Ook hierbij is het goed mogelijk dat verbeteringen in de behandeling van vroeggeborenen bijdragen aan deze verandering over de tijd.

In **hoofdstuk 12** gaan we dieper in op de complexe samenhang tussen chorioamnionitis en chronische longschade. We zien dat beademde vroeggeborenen die blootgesteld zijn aan chorioamnionitis minder goed reageren op behandeling met surfactant. Hierdoor zijn langere beademing en meer zuurstof nodig bij deze kinderen. Dit blijkt met name bij kinderen met ernstige chorioamnionitis te leiden tot een verhoogd risico op chronische longschade. Al met al is de relatie tussen chorioamnionitis en chronische longschade dus complex, en lijkt behandeling met surfactant minder effectief te zijn bij deze kinderen. Mogelijk kan deze behandeling verbeterd worden door meer surfactant te geven of ontstekingsremmende medicijnen toe te voegen aan de behandeling.

Conclusie

De onderzoeken beschreven in dit proefschrift geven nieuwe informatie over de achtergrond van longontwikkeling en longschade bij vroeggeborenen. De resultaten ondersteunen de recent geïntroduceerde theorie van een verandering in de ontstaanswijze van chronische longproblemen in deze groep kinderen. Daarnaast wordt onderstreept hoe chorioamnionitis een proces blijft met intrigerende effecten op ontwikkeling van de long en andere organen. Nader onderzoek is nodig naar de lange termijn effecten van vroeggeboorte en chorioamnionitis in het bijzonder, om de vooruitzichten voor deze kwetsbare groep kinderen in de toekomst te verbeteren (**appendix II**). Verschillende bevindingen uit dit proefschrift kunnen richting geven aan toekomstig onderzoek naar strategieën om chronische longschade in de toekomst beter te behandelen, of nog liever: te voorkomen.

